

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19550

研究課題名(和文) 副腎球状層細胞過剰増殖の分子機構の解明

研究課題名(英文) Understanding of molecular mechanism for overgrowth of the cells in adrenal zona glomerulosa

研究代表者

伊藤 亮 (ITO, Ryo)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80733815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性ペプチドアンジオテンシンII (Ang II)は副腎球状層の過形成を引き起こすが、Ang IIと副腎球状層細胞増殖の関係は良くわかっていない。本研究では、副腎選択的に発現する転写因子 cAMP response element modulator (CREM)の多様なアイソフォームの内、転写抑制型であるInducible cAMP early repressor (ICER) がアンジオテンシンIIによる細胞増殖促進を抑制するといったネガティブフィードバック機構を担っている可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：The bioactive peptide angiotensin II causes hyperplasia in the zona glomerulosa of adrenal gland. Relationship between Ang II stimulation and hyperproliferation of the adrenal cells is still unclear. In this study, we showed that one of CREM isoforms inducible cAMP early repressor (ICER), which is known as a transcriptional repressor, is induced by Ang II in adrenal cell line. And ICER may be responsible for a negative feedback mechanism suppressing adrenal hyperproliferation by Ang II stimulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 内分泌

1. 研究開始当初の背景

副腎皮質の球状層は鉱質コルチコイドであるアルドステロンを合成する場である。生理活性ペプチドアンジオテンシン II (Ang II) は球状層を刺激し、アルドステロンの合成を促進する。Ang II は電解質代謝や血圧調節など生物のホメオスタシスにおいて重要な機能を果たすが、過剰な Ang II の作用はアルドステロンの過剰分泌を引き起こし、高血圧、動脈硬化を惹起する。

2. 研究の目的

Ang II により刺激されるアルドステロン合成は高等生物のホメオスタシスに必須であるが、異常な Ang II の分泌はアルドステロンの過剰分泌や球状層細胞の過剰増殖を引き起こす。この副腎球状層細胞の過剰増殖は、アルドステロン過剰合成の原因となる可能性を包含している。しかしながら、どのようにして球状層の過剰増殖が惹起されるのか、具体的なメカニズムは不明である。そこで本研究では、これまで申請者が得た知見・技術を基に Ang II による副腎皮質球状層細胞増殖刺激の分子基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アルドステロン合成酵素 CYP11B2 は副腎球状層特異的に発現する遺伝子である。申請者はこの CYP11B2 遺伝子座に Green Fluorescent protein (GFP) を組み込んだ Bacterial artificial chromosome (BAC) を用いた Tg マウス (CYP11B2-GFP Tg マウス) の作製に取り組んできた。このマウスでは副腎球状層特異的に GFP タンパク質を発現することが予想される。このマウスを用いて副腎球状層の単離を行い、Ang II 処理時の遺伝子発現変動を解析し、副腎球状層増殖責任因子の同定を行う。

(2) 副腎腫瘍由来の培養細胞を用い、副腎選択的に発現する遺伝子の中から Ang II に応答し、発現変化する遺伝子を探索する。

4. 研究成果

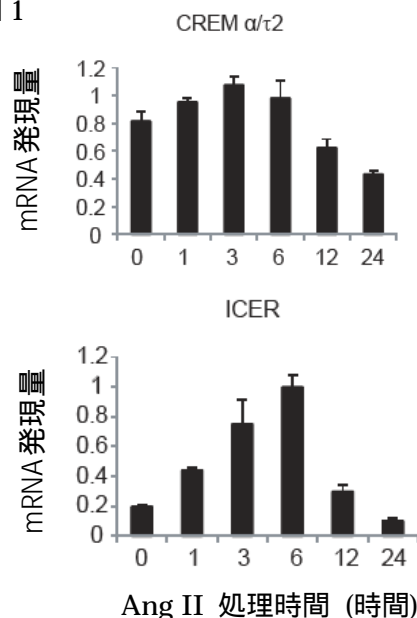
(1) CYP11B2-GFP Tg マウスの作製において 4 系統のマウスを得た。それらのマウス組織を用いて RT-PCR を行い、GFP 遺伝子の発現特異性を検証した。その結果、それらの 4 系統の内、1 系統で副腎特異的に GFP mRNA が発現していることを見出した。今回の実験では CYP11B2 遺伝子の転写開始点上流 10kb から下流 150kb までの領域が含まれる BAC を用いたが、この結果は、これらの領域の中に CYP11B2 の副腎発現特異性を決定する領域が含まれることを示唆するものであった。

(2) 副腎特異的に GFP mRNA を発現する CYP11B2-GFP Tg マウス系統を用い、副腎

球状層細胞の単離を試みた。摘出した副腎から細胞分散液を調製し、フローサイトメーターを用いて解析を行ったが、GFP 陽性細胞を検出することはできなかった。そこで、CYP11B2-GFP 発現量を上昇させる条件として、CYP11B2-GFP つくば高血圧マウスの作出を目指した。つくば高血圧マウスは雌レニン Tg マウスと雄アンジオテンシノーゲン Tg マウスを掛け合わせたダブル Tg マウスであるが、本研究では、雌 CYP11B2-GFP レニン Tg マウスと雄 CYP11B2-GFP アンジオテンシノーゲン Tg マウスを作製した。これらのマウスを交配させ、CYP11B2-GFP つくば高血圧マウス (CYP11B2-GFP^{+/-}, レニン^{+/-}, アンジオテンシノーゲン^{+/-}) を作出した。この系統とコントロール群 (CYP11B2-GFP^{+/-}, レニン^{-/-}, アンジオテンシノーゲン^{-/-}) の副腎における GFP mRNA 発現量の比較を行ったが、GFP mRNA の発現量に変化は見られなかった。これらの結果は、CYP11B2 遺伝子の転写開始点上流 10kb から下流 150kb までの領域は CYP11B2 遺伝子の副腎特異性を規定するには十分であるが、Ang II に応答して CYP11B2 発現量を上昇させるには不十分であることを示唆している。

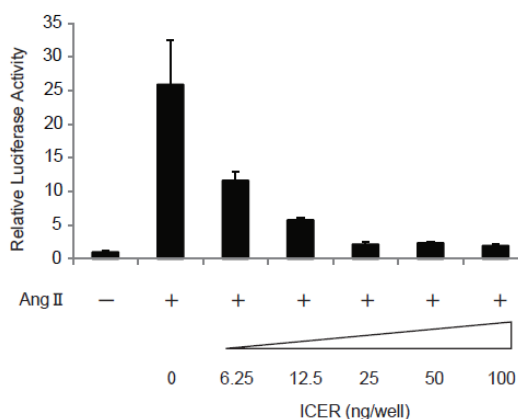
(3) 副腎選択的に発現する遺伝子の中から Ang II により発現変動する遺伝子を探索した。CREB ファミリーに属する転写因子である cAMP response element modulator (CREM) に着目した。CREM には多数のスプライシングアイソフォームの存在が報告されている。そこで副腎腫瘍由来である H295R 細胞を用いて Ang II に応答する CREM アイソフォームの解析を行った。その結果、CREM $\alpha/\tau 2$ タイプの発現に大きな変化は見られないが、Inducible cAMP early repressor (ICER) タイプの発現が大きく上昇することが明らかになった (図 1)。

図 1



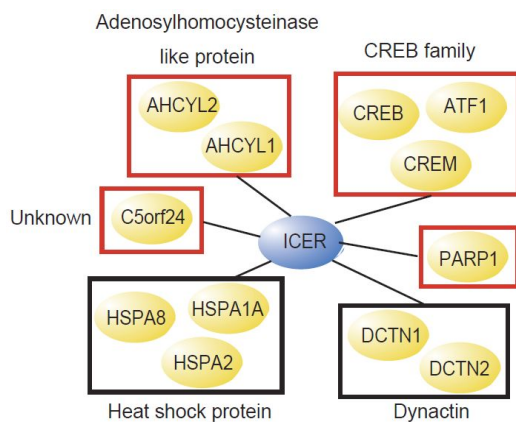
(4) ICER は cAMP response element (CRE) に結合し、転写抑制的に機能する CREM アイソフォームであることが報告されている。また、Ang II は多様なシグナル伝達を介して CRE 配列を持つプロモーターを活性化させることが報告されている。そこで、H295R 細胞において Ang II 刺激により活性化される CRE プロモーターの活性化に対する ICER 発現の影響をレポーターアッセイにより検証した。その結果、ICER の発現量依存的に CRE プロモーターによる転写が抑制されることが明らかとなった (図 2)。

図 2



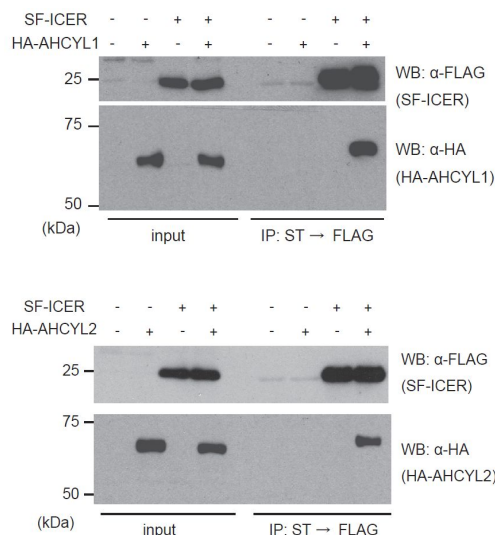
(5) 副腎培養細胞において CREB ファミリーに属する ICER がどのように転写を調節するのか、その分子機構は不明である。そこで、ICER がどのような複合体を形成して転写を調節するのかを明らかにすることで詳細な分子機構の解明を目指した。Strep tag II と FLAG tag のタンデムタグと融合した ICER (SF-ICER) を発現する H295R 細胞株を作製し、各タグを利用した二段階精製を行った。さらに、精製産物を用いた質量分析を行い、ICER と相互作用する候補因子として Adenosylhomocysteinase like protein (AHCYL1/2)をはじめとしたいくつかのタンパク質を同定した。

図 3



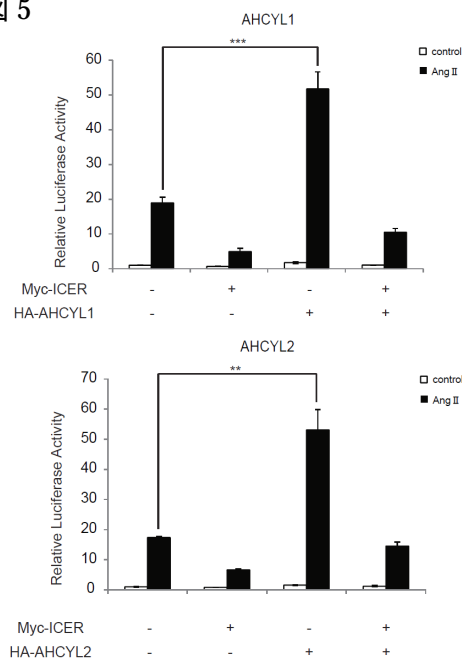
(6) 同定された AHCYL1 及び AHCYL2 と ICER の相互作用について、免疫沈降法及びウエスタンブロットングによる再評価を行った。SF-ICER 及び HA-AHCYL1 もしくは HA-AHCYL2 をヒト腎臓腫瘍由来である HEK293T 細胞に発現させ、SF タグを用いた二段階精製を行い、ウエスタンブロットングに供した。その結果、AHCYL1 及び AHCYL2 は ICER と相互作用することが検証できた (図 4)。

図 4



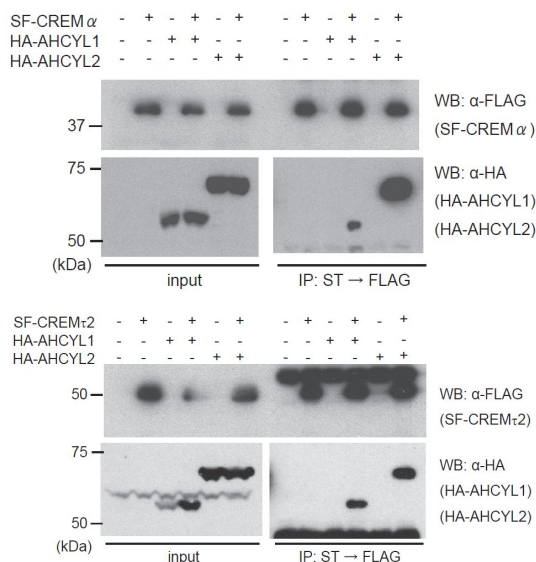
(7) AHCYL1 及び AHCYL2 の CRE プロモーターにより活性化される転写活性への影響をレポーターアッセイにより解析した。興味深いことに AHCYL1 及び AHCYL2 は CRE プロモーター活性を上昇させ、さらにその転写活性化は ICER の共発現により抑制された (図 5)。

図 5



(8) ICER は転写抑制因子であり、AHCYL1 及び AHCYL2 による転写活性化は ICER との相互作用では説明できない。そこで、AHCYL1 及び AHCYL2 と ATF1 や他の CREM アイソフォームの相互作用を検証した。その結果、転写活性化型の CREM τ 2 と相互作用することが示された (図 6)。

図 6



(9) AHCYL1 及び AHCYL2 は CREM τ 2 との相互作用を介して CRE プロモーターを活性化するが、一旦 Ang II 刺激により ICER の発現が誘導されると、AHCYL1/2 の有無に関わらず遺伝子発現が抑制される。これらの結果は ICER を介した Ang II 刺激に対するネガティブフィードバック機構が存在することを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Suzuki Dai, Saito-Hakoda Akiko, Ito Ryo, et al. (15 人中 3 番目), Suppressive effects of RXR agonist PA024 on adrenal CYP11B2 expression, aldosterone secretion and blood pressure., PLOS ONE, 12 (8), 査読有, 2017, e0181055
DOI: 10.1371/journal.pone.0181055.

Ito Ryo, Sato Ikuko, Tsujita Tadayuki, et al. (5 人中 1 番目), A ubiquitin-proteasome inhibitor bortezomib suppresses the expression of CYP11B2, a key enzyme of aldosterone synthesis., Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 489 (1), 2017, 21-28
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.109.

〔学会発表〕(計 2 件)

伊藤 亮, 化合物スクリーニングを用いた CYP11B1 発現制御機構の解明、日本内分泌学会東北地方会、2017

伊藤 亮, 化合物スクリーニングを用いたアルドステロン合成酵素 CYP11B2 遺伝子発現制御機構の解析、日本内分泌学会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: アルドステロン合成酵素発現阻害剤
発明者: 菅原明、伊藤亮
権利者: 国立大学法人東北大学
種類: 特許
番号: 特願 2017-64702
出願年月日: 2017 年 3 月 29 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 亮 (ITO, Ryo)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 80733815

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()